

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-21-27>



ОПЫТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ МАКАК-РЕЗУСОВ ПО ГЕНАМ КЛАССА I ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

С.В. Орлов¹, А.А. Агумава¹, И.Д. Курдюков², П.П. Бельтюков^{2,*}

¹ Курчатовский комплекс медицинской приматологии, НИЦ «Курчатовский институт»
354376, Российская Федерация, Сочи, Адлерский р-н, с. Весёлое, ул. Мира, стр. 177

² ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии
и экологии человека» ФМБА России
188663, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский м/р-н,
г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, зд. 6/2, корп. 93

Полезность биомодели в доклинических исследованиях зависит от полноты знаний о ней. Нечеловекообразные приматы — единственная из близких к человеку биомodelей, доступных для доклинической оценки биотехнологических продуктов. Отсутствие иммуногенетических характеристик используемых приматов существенно ограничивает возможности анализа полученных результатов. Наличие сведений о гаплотипе главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) повышает ценность биомодели. Генотипирование приматов по локусу МНС путём анализа ДНК исключено, поскольку представленность отдельных белков МНС зависит не от их присутствия в геноме биомодели, а от уровня экспрессии в клетках. Поэтому генотипирование приматов по локусу МНС проводят путём анализа мРНК, кодирующих аллельные варианты белков. В представленной работе приведены результаты генотипирования выборки макак-резусов из коллекции Курчатовского комплекса медицинской приматологии с использованием технологии секвенирования следующего поколения на секвенаторе IonProton.

Ключевые слова: макаки-резусы, главный комплекс гистосовместимости, генотипирование

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1065.

Для цитирования: Орлов С.В., Агумава А.А., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П. Опыт генотипирования коллекции макак-резусов по генам класса I главного комплекса гистосовместимости. *Биомедицина*. 2024;20(3):21–27. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-21-27>

Поступила 08.04.2024

Принята после доработки 10.06.2024

Опубликована 10.09.2024

EXPERIENCE OF GENOTYPING OF THE CLASS 1 MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENES IN A RHESUS MACAQUES COLLECTION

Sergey V. Orlov¹, Aslan A. Agumava¹, Ivan D. Kurdyukov², Petr P. Beltyukov^{2,*}

¹ Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute
354376, Russian Federation, Sochi, Adler District, Veseloe Village, Mira Str., 177

² Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
188663, Russian Federation, Leningrad Region, Vsevolozhsky Municipal District,
Kuzmolovsky Urban Settlement, Zavodskaya Str., 6/2, Build. 93

The utility of animal models in preclinical research depends on the completeness of our knowledge about these models. Nonhuman primates are the closest animal model to humans, available for preclinical evaluation of biotechnological products. The lack of immunogenetic characteristics of the primates used in a particular study significantly limits the possibilities of analyzing the results obtained. The availability of information about the haplotype of the major histocompatibility complex (MHC) increases the overall significance of the model. Genotyping of primates at the MHC locus by DNA analysis is excluded, since the representation of individual MHC proteins depends on the level of their expression in immune cells, rather than on their presence in the genome. Therefore, the genotyping of primates at the MHC locus is carried out by analyzing mRNA encoding allelic variants of proteins. This work presents the results of genotyping of a sample of rhesus macaques from the collection of the Kurchatov Complex of Medical Primatology by a next-generation sequencing technology using an IonProton sequencer.

Keywords: rhesus macaques, major histocompatibility complex, genotyping

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-15-2021-1065.

For citation: Orlov S.V., Agumava A.A., Kurdyukov I.D., Beltyukov P.P. Experience of Genotyping of the Class 1 Major Histocompatibility Complex Genes in a Rhesus Macaques Collection. *Journal Biomed.* 2024;20(3):21–27. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-21-27>

Submitted 08.04.2024

Revised 10.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Нечеловекообразные приматы (НЧП) являются важной биомоделью для оценки безопасности и эффективности фармакологических средств, создаваемых на основе биотехнологических разработок. Поэтому генотипирование макак по главному комплексу гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) — одно из условий, обеспечивающих полноту характеристики биомодели. Для коллекций НЧП, имеющих в России, отсутствуют иммуногенетические характеристики гаплотипов белков главного комплекса гистосовместимости, поэтому в ходе доклинических исследований не могут быть учтены возможные особенности индивидуального ответа, обусловленные гаплотипом белков МНС.

Сложность строения и особенности экспрессии генов МНС приматов не позволя-

ют использовать методы анализа, пригодные для генотипирования по локусу HLA у человека, и диктуют особые требования при типировании НЧП [8].

Гены, кодирующие белки МНС, являются наиболее полиморфными в геноме позвоночных животных. В связи с этим полноценная интерпретация данных об адаптивном гуморальном и/или клеточном иммунном ответе на воздействие новых средств при проведении доклинических испытаний требует знаний о структуре соответствующих рецепторов МНС, вовлечённых в процессы представления антигенов.

Макаки-резусы (*Macaca mulatta*) филогенетически близки к человеку и активно используются при изучении механизмов биологической защиты от инфекций и иммунного ответа при трансплантации и вакцинации [6]. Различия в локусе МНС

у макак-резусов из разных регионов подтверждаются результатами генотипирования популяций животных разного происхождения в коллекциях приматов по всему миру. Отличительная особенность МНС приматов — наличие «избыточного» количества генов, кодирующих эти белки. Так, у человека гаплотипы генов HLA класса I содержат только три главных гена (*HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*) и три минорных (*HLA-E*, *HLA-F* и *HLA-G*), а в локусе МНС класса I макак в процессе эволюции произошли неоднократные сегментарные удвоения, поэтому у животных с разными гаплотипами МНС количество генов (*Mamu*), кодирующих белки МНС, может различаться [1]. У макак экспрессируются несколько аллелей гена *Mamu-A* и до 10 вариантов *Mamu-B*. Многие аллели генов МНС I экспрессируются на достаточно низких уровнях, а иногда вообще не экспрессируются. Такая дифференциация может быть достигнута только при наличии надёжного транскрипционного контроля [7]. Иммунный ответ на патогены происходит только за счёт тех аллелей МНС, которые экспрессируются на самом высоком уровне. Анализ транскрипции генов локуса МНС I даёт возможность максимально полно охарактеризовать биомодель и сравнить с человеком на более высоком уровне по сравнению с теми возможностями, которые даёт секвенирование ДНК [2]. Необходимость исследований в данном направлении подтверждается публикациями последних лет, в которых были продемонстрированы возможности использования НЧП для моделирования патологических состояний человека, риск которых возрастает при наличии ряда аллельных вариантов HLA класса I, например, *HLA-B*27* [5]. В работах по моделированию иммунодефицитных состояний, вызываемых у обезьян вирусом SIV (simian immunodeficiency virus), показано, что наличие аллелей *Mamu* (*A*02*, *A*08*, *A*11* и *B*01*, *B*03*) обеспечивает представ-

ление антигенов, характерных для вариантов *HLA-B* человека, благодаря высокой гомологии пептид-связывающих участков белковых молекул *HLA-B* (*B*18:01*, *B*27:09*, *B*27:03*, *B*51:01*, *B*40:06*) и перечисленных вариантов *Mamu* [3].

Цель работы — разработка метода генотипирования локуса МНС I макак-резусов на основе анализа результатов секвенирования фрагмента генов *Mamu-A* и *Mamu-B* с использованием технологии NGS на секвенаторе IonProton и частичная характеристика популяции макак-резусов из коллекции Курчатовского комплекса медицинской приматологии.

Материалы и методы

Источник биоматериала — мононуклеарные клетки периферической крови, выделенные путём центрифугирования в градиенте ρ -ра фиколла (1,077 г/см³, «Биолот», Россия). Клеточный осадок обрабатывали реагентом RNA Later и сохраняли образцы при -70°C . Для выделения РНК и очистки от примесей ДНК использовали наборы RNeasy Mini Kit и RNase-Free DNase Set («Qiagen», Германия), соответственно. Образцы кДНК получили с помощью набора High-Capacity RNA-to-cDNA Kit («Applied Biosystems», США) и сохраняли при -70°C .

Целевой регион для секвенирования — фрагменты генов *Mamu*, соответствующие, в основном, $\alpha 1$ -домену белка. Амплификацию ген-специфичных участков выполняли с использованием праймеров, соответствующих консервативным последовательностям в пределах локусов МНС IA и IB [9]. Размер вставки равен 190 пар оснований (п.н.).

Праймеры (5'-3'):

F: GCTACGTGGACGACACG

R: TCGCTCTGTTGTAGTAGC

Конструирование библиотек

Амплификацию таргетного участка выполняли на амплификаторе T100

(«Bio-Rad», США) в смеси: 23 мкл реагента Platinum PCR SuperMix High Fidelity («Invitrogen», США), 1 мкл смеси олигонуклеотидов (по 5 пмоль) и 1 мкл кДНК. Конечная концентрация каждого олигонуклеотида — 200 нмоль/л. Для каждого образца использовали специфический прямой праймер с баркодом и одинаковый для всех образцов обратный праймер. Все образцы на стадии амплификации содержали индивидуальную метку из набора баркодов Ion Xpress DNA (01-35).

Программа амплификации: инициализация (94°C, 2 мин), затем 40 циклов: денатурация (94°C, 15 с), отжиг (55°C, 30 с), элонгация (68°C, 30 с). При успешной амплификации ПЦР-продукт при электрофорезе в агарозном геле выявлялся в виде единственной полосы, соответствующей полинуклеотиду размером 256 п.н. Продукты амплификации смешивали в соотношениях, близких к эквимольным. Полученную смесь очищали на магнитных частицах AMPure XP («Beckman Coulter», США), растворяли в воде, свободной от нуклеаз, и сохраняли при –20°C. Молярная концентрация библиотеки, измеренная с использованием набора Qubit DNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 («Life Technologies», США), составила 43,1 нмоль/л.

Клональную амплификацию и обогащение библиотеки кДНК с использованием набора реагентов Ion PI Template OT2 200 Kit v3 выполняли на оборудовании Ion OneTouch™ 2 System с модулем обогащения темпированных микросфер Ion OneTouch ES («Life Technologies», США) по протоколам производителя. Секвенирование выполнено на секвенаторе Ion Proton с применением набора реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 и чипов для секвенирования Ion PI Chip Kit v2 по протоколу производителя.

При первичной биоинформационной обработке выполнена фильтрация прочтений по качеству и удаление адаптерных после-

довательностей с использованием Torrent Suite Software. В результате получены файлы в формате FASTQ, с уникальными последовательностями (от 9×10^5 до 3×10^6 для каждого образца), из которых после обработки получили по 25–250 тыс. пригодных для анализа прочтений. Фильтрацию данных и отбор длинных прочтений из файлов FASTQ проводили с применением ПО PRINSEQ. На завершающей фазе анализа для выравнивания на референсные последовательности использовали только длинные чтения (180–200 п.н.). Такая обработка позволила получить для каждого образца от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч прочтений, пригодных для генотипирования. Этот «запас прочности» необходим для последующего эффективного выравнивания полученных массивов прочтений при использовании выбранной технологии NGS.

В качестве референса использовали последовательности локуса *Mamu* из базы IPD-MHC Database (версия 3.9.0.0) (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/NHP/>). Из общей базы нуклеотидных последовательностей FASTA отфильтрованы только последовательности генов MHC I. Референс для локуса *Mamu* содержал 484 варианта *Mamu-A*, 947 вариантов *Mamu-B*, 32 варианта *Mamu-E*, 9 вариантов *Mamu-G*, 24 варианта *Mamu-F*, 110 вариантов *Mamu-I*, 25 вариантов *Mamu-J*, 3 варианта *Mamu-K* и 155 вариантов *Mamu-AG* (всего 1789 последовательностей). Из этого числа для выравнивания прочтений после удаления ген-специфичных фрагментов праймеров использовали 602 короткие уникальные последовательности (размером ~154 п.н.).

Длинные чтения в формате FASTQ выравнивали на референс при помощи ПО STAR, используя настройку, позволяющую выравнивать чтения от начала и до конца, исключить возможное обрезание прочтения, а также запретить несоответствия «mismatch» при выравнивании, но без за-

прета инсерций и делеций. При выравнивании прочтения сортировались по координатам и представлялись в формате BAM. Файл индекса генерировался с помощью утилит SAMtools. Дублированные прочтения, связанные с «разрешением» инсерций и делеций, были удалены с использованием утилиты SAMtools.

Визуализацию прочтений и типирование аллелей МНС каждого образца выполняли с использованием графического средства просмотра Tablet. Минорные варианты, для которых доля прочтений оказалась < 1%, были исключены из анализа. В результате биоинформационной обработки для каждого примата получены данные о геномном варианте МНС I, позволяющие отнести его к той или иной аллельной группе.

Для исключения ложноположительных результатов проведена оценка специфичности праймеров. Последовательности праймеров выравнены на 1789 вариантах МНС I локуса *Mamu* версии 3.9.0.0 IPD-МНС. Оказалось, что 79 из 1789 вариантов имеют несоответствия на 3'-конце хотя бы одного из праймеров, поэтому амплификация ПЦР-продуктов этих вариантов невозможна. К таким вариантам относятся гены *Mamu-E*, *Mamu-F* и *Mamu-J*. Кроме того, при анализе оказалось, что 174 из 1789 вариантов будут иметь несоответствия в зоне посадки праймеров (не на 3'-конце). Амплификация ПЦР-продуктов таких вариантов также может быть затруднена и приведёт к снижению доли соответствующих картированных прочтений.

Результаты и их обсуждение

Выполнено генотипирование 25 образцов РНК макак-резусов с целью установления экспрессируемых вариантов генов *Mamu*. Показано, что у этих животных экспрессируются от 4 до 12 «мажорных» аллельных вариантов МНС I, доля которых среди картированных прочтений составляет более 1%.

В качестве примера результатов генотипирования на рисунке приведена диаграмма распределения вариантов МНС I у одного из исследованных животных.

В исследованных образцах «мажорные» варианты представлены генами *Mamu-A1* и *Mamu-B*. Среди вариантов *Mamu-A1* наиболее частыми оказались *A1*002:01:01* (13 образцов, 52%) и *A1*019/A1*003* (8 образцов, 32%). Среди вариантов *Mamu-B* наиболее распространёнными оказались *B*074* (17 образцов, 68%) и *B*012:01:01* (12 образцов, 48%). Наиболее распространённым вариантом *Mamu-A1* в изученной популяции макак-резусов оказался вариант *A1*002*, который является типичным для макак индийского происхождения и крайне редок в популяциях макак китайского происхождения [4].

При анализе полученных результатов проведена попытка сравнить наши результаты с данными о генотипировании популяций макак-резусов из коллекций китайского и индийского происхождения [4]. В исследовании

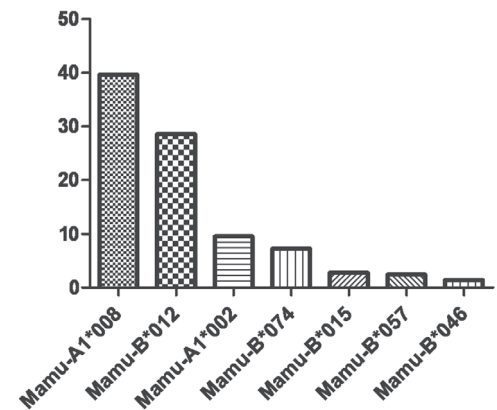


Рис. Пример паттерна экспрессии генетических вариантов МНС I макак-резусов. Представлены выявленные генетические варианты МНС I и их доля (в процентах от общего числа картированных прочтений) у самца 46782.

Fig. Example of an expression pattern of genetic variants of MHC I in Rhesus Macaques. The identified MHC I genetic variants and their share (as a percentage of the total number of mapped reads) in male 46782 are presented.

дованной группе полностью отсутствуют животные с вариантами генов *Mamu-A*, характерных для китайских популяций. Это наблюдение относится к вариантам *A1*009*, *A1*010*, *A1*027*, *A1*032* и к целому ряду других редких «китайских» вариантов *Mamu-A*.

Лишь у одного животного — самца под номером 37970, в родословной которого были предки индийского и вьетнамского происхождения, — выявлен вариант *Mamu-A2*24*, для которого имеются сведения о распространённости в китайских популяциях макак-резусов. К сожалению, отсутствие сведений о родительских и прародительских гаплотипах МНС I дальше третьего колена не позволяет говорить о возможном источнике найденного варианта. Ещё один вариант, нетипичный для индийских популяций, *A1*091* — выявлен у двух самцов под номерами 36616 и 36758. Оба этих животных имеют в шестом и в пятом коленах общего предка китайского происхождения.

Таким образом, варианты генов *Mamu-A*, выявленные у животных в исследованной коллекции, в целом соответствуют имеющимся сведениям о распространённости вариантов *Mamu-A* в различных популяциях макак-резусов, опубликованных другими исследователями.

Анализ вариантов генов *Mamu-B*, определённых при генотипировании животных из коллекции, показал, что наиболее распространённые варианты *Mamu-B*074*, *B*012* и *B*057* в исследуемой популя-

ции животных являются типичными для животных индийского происхождения и по данным публикации [8], при этом *B*074* и *B*057* — редко встречаются среди животных китайского происхождения, а *B*012*, по данным зарубежных авторов, в китайской популяции не выявляется вообще. Также показано наличие вариантов *Mamu-B*019*, *B*022*, *B*024*, *B*027*, характерных для макак индийского происхождения. Ещё один распространённый вариант — *Mamu B*046* выявлен у 10 обследованных животных (40%).

Варианты *Mamu-B*, типичные для китайских популяций (*B*034*, *B*086*), обнаружены у животных, для которых подтверждено наличие предков из китайской популяции.

Выводы

Полученные в ходе исследования результаты подтвердили возможность применения использованной технологии NGS для анализа локуса МНС макак, была оценена экспрессия вариантов *Mamu-A* и *Mamu-B* в мононуклеарных клетках периферической крови животных, включённых в исследование.

По мере накопления данных о гаплотипах МНС I нечеловекообразных приматов, используемых в доклинических исследованиях, понадобятся дальнейшие исследования для анализа роли гаплотипа МНС биомодели в реализации иммунного ответа при воздействии биотехнологических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Котова Е.С., Каныгина А.В., Желанкин А.В., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Генерозов Э.В., Шарова Е.И. Генотипирование макак-резусов по генам главного комплекса гистосовместимости *Mamu-A* и *Mamu-B* с использованием нанопорового секвенирования. В сб.: III Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике». Новосибирск: Академиздат, 2022:122. [Kotova E.S., Kanygina A.V., Zhelankin A.V., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Generezov E.V., Sharova E.I. Genotipirovanie makak-rezususov po genam glavnogo kompleksa gistosovmestimosti *Mamu-A* i *Mamu-B* s ispol'zovaniem nanoporovogo sekvenirovaniya [Genotyping of rhesus macaques by genes of the main histocompatibility complex *Mamu-A* and *Mamu-B* using nanopore sequencing]. V sb.: III Vserossiyskaya konferentsiya "Vysokoproizvoditel'noe sekvenirovanie v genomike". [In: III All-Russian conference "High-performance sequencing in genomics"]. Novosibirsk: Akademizdat Publ., 2022:122. (In Russian)].

2. Budde M.L., Lhost J.J., Burwitz B.J., Becker E.A., Burns C.M., O'Connor S.L., Karl J.A., Wiseman R.W., Bimber B.N., Zhang G.L., Hildebrand W., Brusic V., O'Connor D.H. Transcriptionally abundant major histocompatibility complex class I alleles are fundamental to nonhuman primate simian immunodeficiency virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Virol.* 2011;85(7):3250–3261. DOI: 10.1128/JVI.02355-10
3. Hickman-Miller H.D., Bardet W., Gilb A., Luis A.D., Jackson K.W., Watkins D.I., Hildebrand W.H. Rhesus macaque MHC class I molecules present HLA-B-like peptides. *J. Immunol.* 2005;175(1):367–375. DOI: 10.4049/jimmunol.175.1.367
4. Karl J.A., Bohn P.S., Wiseman R.W., Nimityongskul F.A., Lank S.M., Starrett G.J., O'Connor D.H. Major histocompatibility complex class I haplotype diversity in Chinese rhesus macaques. G3 (Bethesda). 2013;3(7):1195–1201. DOI: 10.1534/g3.113.006254
5. Loffredo J.T., Sidney J., Bean A.T., Beal D.R., Bardet W., Wahl A., Hawkins O.E., Piaskowski S., Wilson N.A., Hildebrand W.H., Watkins D.I., Sette A. Two MHC class I molecules associated with elite control of immunodeficiency virus replication, *Mamu-B*08* and *HLA-B*2705*, bind peptides with sequence similarity. *J. Immunol.* 2009;182(12):7763–7775. DOI: 10.4049/jimmunol.0900111
6. Maness N.J. The importance of understanding MHC-I diversity in nonhuman primate models of human infectious diseases. *Toxicol. Pathol.* 2017;45(1):157–160. DOI: 10.1177/0192623316672072
7. Otting N., Heijmans C.M., Noort R.C., de Groot N.G., Doxiadis G.G., van Rood J.J., Watkins D.I., Bontrop R.E. Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(5):1626–1631. DOI: 10.1073/pnas.0409084102
8. Rogers J. Genomic resources for rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Mammalian Genome.* 2022;33:91–99. DOI: 10.1007/s00335-021-09922-z
9. Wiseman R.W., Karl J.A., Bimber B.N., O'Leary C.E., Lank S.M., Tuscher J.J., Detmer A.M., Bouffard P., Levenkova N., Turcotte C.L., Szekeres E. Jr., Wright C., Harkins T., O'Connor D.H. Major histocompatibility complex genotyping with massively parallel pyrosequencing. *Nature Medicine.* 2009;15(11):1322–1326. DOI: 10.1038/nm.2038

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Орлов Сергей Владимирович, д.м.н., проф., член-корр. РАН, Курчатовский комплекс медицинской приматологии, НИЦ «Курчатовский институт»;
e-mail: orloff-sv@mail.ru

Sergey V. Orlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute;
e-mail: orloff-sv@mail.ru

Агумава Аслан Анзорович, к.б.н., Курчатовский комплекс медицинской приматологии, НИЦ «Курчатовский институт»;
e-mail: aslan39@yandex.ru

Aslan A. Agumava, Cand. Sci. (Biol.), Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute;
e-mail: aslan39@yandex.ru

Курдюков Иван Дмитриевич, ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России;
e-mail: splachnum@yandex.ru

Ivan D. Kurdyukov, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: splachnum@yandex.ru

Бельтюков Пётр Петрович*, к.м.н., доц., ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России;
e-mail: biochem2005@rambler.ru

Petr P. Beltyukov*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: biochem2005@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author